

日 本 国 特 許
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP 00/07464

庁	REC'D 08 DEC 2000 25 10.00
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 4月10日

JP00/7464

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-107855

3 BW

出 願 人
Applicant (s):

昭和電工株式会社

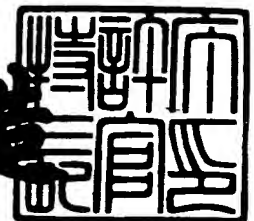
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年12月 1日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3099304

【書類名】 特許願

【整理番号】 11H120068

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内

【氏名】 蒲池 晴美

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内

【氏名】 青木 裕史

【特許出願人】

【識別番号】 000002004

【氏名又は名称】 昭和電工株式会社

【代表者】 大橋 光夫

【代理人】

【識別番号】 100094237

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢口 平

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010227

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9702281

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 2 または 3 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列を含むロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

【請求項 2】 配列表の配列番号 5 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列を含むロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子。

【請求項 3】 ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (R h o d o c o c c u s s p .) ATCC 39484 株である請求項 1 に記載のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

【請求項 4】 ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (R h o d o c o c c u s s p .) ATCC 39484 株である請求項 2 に記載のアミダーゼ遺伝子。

【請求項 5】 請求項 1 または 3 に記載の遺伝子 DNA を含むプラスミド。

【請求項 6】 請求項 2 または 4 に記載の遺伝子 DNA を含むプラスミド。

【請求項 7】 請求項 1 または 3 に記載の遺伝子 DNA と、請求項 2 または 4 に記載の遺伝子 DNA の両方を含むプラスミド。

【請求項 8】 請求項 5 に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【請求項 9】 請求項 6 に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【請求項 10】 請求項 7 に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【請求項 11】 請求項 8 または 10 に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からニトリルヒドラターゼを採取することを特徴とするニトリルヒドラターゼの製造法。

【請求項 12】 請求項 9 または 10 に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からアミダーゼを採取することを特徴とするアミダーゼの製造法。

【請求項 13】 請求項 8 に記載の形質転換体を用いてニトリル類のニトリ

ル基をアミド基に変換することを特徴とするアミド類の製造法。

【請求項 1 4】 請求項 9 に記載の形質転換体を用いてアミド類のアミド基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

【請求項 1 5】 請求項 1 0 に記載の形質転換体を用いてニトリル類のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

【請求項 1 6】 ニトリル類が、オルソフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、アミド類が、対応するオルソシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミドである請求項 1 3 に記載のアミド類の製造法。

【請求項 1 7】 アミド類が、オルソシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミド類であり、カルボン酸類が、対応するオルソシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である請求項 1 4 に記載のカルボン酸類の製造法。

【請求項 1 8】 ニトリル類が、オルソフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、カルボン酸類が、対応するオルソシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である請求項 1 5 に記載のカルボン酸類の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】

本発明は、ニトリル類、特に芳香族ポリニトリル化合物のニトリル基に対し、特に優れた位置選択性を示すロドコッカス属細菌由来のニトリル分解系酵素であるニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子およびアミダーゼをコードする遺伝子の DNA 配列、それを用いた該酵素タンパク質の製造法、さらには該酵素を用いたアミド類またはカルボン酸類の製造法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼはそれぞれニトリル化合物をアミドに、アミドをカルボン酸に変換する反応を触媒する酵素である。ニトリルヒドラタ

ーゼおよびアミダーゼを用いることによってニトリル化合物から、医農薬原料等に有用なアミドまたはカルボン酸を得ることができる。ニトリル化合物をそれぞれ相当するアミドまたはカルボン酸に変換する方法が生体触媒の利用によって開発され、このような触媒能をもつ微生物が数多く報告されている（特公昭56-17918号公報、特公昭59-37951号公報、特公昭61-162193号公報、特公昭61-21519号公報、特公昭64-86889号公報、特公平4-197189号公報、特開平2-470公報、EP0444640など）。

【0003】

また、これらの微生物からはニトリルヒドラターゼやアミダーゼあるいはニトリラーゼが精製され、さらにはこれらの酵素の遺伝子工学的利用を計るため、その遺伝子が単離され一次構造が決定されている。ニトリルヒドラターゼ遺伝子については、例えばロドコッカス属細菌由来の遺伝子が米国特許番号第2840253号やEP0445646（特開平4-211379号公報）において、シュードモナス属細菌由来の遺伝子が特開平3-251184号公報において、リゾビウム属細菌由来の遺伝子が特開平6-25296号公報や特開平6-303971号公報において、またアミダーゼ遺伝子については、例えばブレバクテリウム属細菌とロドコッカス属細菌由来の遺伝子がEP0433117において開示されている。また、ロドコッカス・エリスロポリス由来の遺伝子がEur. J. Biochem. 217(1), 327-336(1993)において、シュードモナス属細菌由来の遺伝子がFEBS Lett. 367, 275-279(1995)において報告されている。

【0004】

さらにロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ両遺伝子を含む組換え体プラスミドに関する発明が特開平5-68566号公報において開示されている。

【0005】

近年、このような微生物がもつニトリル化合物の変換能を応用する試みがなされている。特に付加価値の高い化合物の製造に利用するために、立体選択性や位

置選択性に優れた酵素が望まれている。例えば、特開平 2 - 8 4 1 9 8 号公報には光学活性な α - 置換有機酸の製造に用いる微生物について、特開平 4 - 3 4 1 1 8 5 号公報には光学活性な 2 - ヒドロキシカルボン酸の製造に用いる微生物について、E P 0 4 3 3 1 1 7 には光学活性なケトプロフェンの製造に用いる微生物についてそれぞれ開示されている。

【0006】

このような微生物のうち、ロドコッカス エスピー (Rhodococcus s.p.) ATCC 39484 株は複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつことが報告されている (US 556625)。この選択的なニトリル分解酵素系によって生成されるニトリル基とアミド基、ニトリル基とカルボキシル基を分子内に持つ化合物は医薬製造の合成ブロックとして極めて有効であるが、本菌の持つニトリル変換活性は工業的に利用するためには低く、反応を触媒する酵素の生産性を向上させることが望まれていた。しかし、これらの改良に必要な本菌の関連酵素遺伝子はニトリルヒドラターゼ、アミダーゼのいずれについても明らかにされていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的はロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼを、遺伝子工学的手法を用いて効率良く生産したり、タンパク質工学的手法を用いて改良するために必要なロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子、アミダーゼ遺伝子の DNA 配列、該遺伝子を含む形質転換体を用いた酵素の製造法、および該形質転換体あるいはそれらによって製造された酵素を用いたアミド類またはカルボン酸類の製造法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、下記 (1) ~ (18) の構成を有する。

(1) 配列表の配列番号 2 または 3 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

(2) 配列表の配列番号 5 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列

からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子。

(3) ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (Rhodococcus us sp.) ATCC 39484 株である (1) に記載のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

(4) ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (Rhodococcus us sp.) ATCC 39484 株である (2) に記載のアミダーゼ遺伝子。

(5) (1) または (3) に記載の遺伝子DNAを含むプラスミド。

(6) (2) または (4) に記載の遺伝子DNAを含むプラスミド。

(7) (1) または (3) に記載の遺伝子DNAと、(2) または (4) に記載の遺伝子DNAの両方を含むプラスミド。

【0009】

(8) (5) に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

(9) (6) に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

(10) (7) に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

(11) (8) または (10) に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からニトリルヒドラターゼを採取することを特徴とするニトリルヒドラターゼの製造法。

(12) (9) または (10) に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からアミダーゼを採取することを特徴とするアミダーゼの製造法。

(13) (8) に記載の形質転換体を用いてニトリル類のニトリル基をアミド基に変換することを特徴とするアミド類の製造法。

【0010】

(14) (9) に記載の形質転換体を用いてアミド類のアミド基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

(15) (10) に記載の形質転換体を用いてニトリル類のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

(16) ニトリル類が、オルソフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、アミド類が、対応するオルソシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミドである (13) に記載の

アミド類の製造法。

(17) アミド類が、オルソシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミド類であり、カルボン酸類が、対応するオルソシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である(14)に記載のカルボン酸類の製造法。

(18) ニトリル類が、オルソフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、カルボン酸類が、対応するオルソシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である請求項15に記載のカルボン酸類の製造法。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

ロドコッカス エスピー (Rhodococcus sp.) ATCC39484株染色体DNAは、例えばSaitoらの方法(Biochem. Biophys. Acta. 72, 619(1963))を応用して調製することができる。遺伝子のクローニングに用いる染色体DNAライブラリーは、例えばpUC18などのプラスミドベクターを用いて作成することができる。ニトリルヒドラターゼ遺伝子とアミダーゼ遺伝子のクローニングは、例えばSaikiらのPolymerase Chain Reaction(PCR)法(Science 230, 1350(1985))を用いて得られた部分断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより行うことができる。この時、使用するPCR用プライマーの一方は、ユニバーサルプライマー(フォワードまたはリバース)とし、他方は目的酵素タンパク質のN末端配列を解析し、それをコードする配列から、適当な配列を選抜する。これらのプライマーを組み合わせ、染色体DNAライブラリーを鋳型としてアンカーPCRを行うことによって、目的酵素のコード配列断片を得ることができる。このアンカーPCR法で得たニトリルヒドラターゼコード配列あるいはアミダーゼコード配列DNA断片を全遺伝子領域スクリーニング用プローブとして使用することにより、ロドコッカス エスピー (Rhodococcus sp.) ATCC39484株の染色

体DNAライブラリーからニトリルヒドラターゼ遺伝子および／またはアミダーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを得ることができる。ニトリルヒドラターゼコード配列断片およびアミダーゼコード配列断片のDNA配列は、Sangerらによるdideoxy法(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463 (1997))など公知の手法を用いて決定することができる。

【0012】

得られた酵素構造遺伝子を用いて酵素を生産するためには、酵素構造遺伝子を適当な発現ベクター、例えばpUC18のlacプロモーターの下流に接続するなどして作成することができる。このようにして作成したプラスミドを用いて、例えば大腸菌JM101株(Eschericia coli JM101)などの宿主を形質転換する。この形質転換体を培養することにより、該ニトリルヒドラターゼおよび／またはアミダーゼが宿主細胞内に著量生産される。この酵素は菌体のまま変換反応に使用することもできるが、菌体を破碎して無細胞抽出液として、あるいは精製酵素として使用することもできる。

【0013】

本発明のカルボン酸類またはアミド類の製造法は、例えば原料となる化合物と、変換活性を有する菌体、無細胞抽出液あるいは酵素を、リン酸緩衝液のごとき希薄水溶液に加え、反応液pHを5～10、望ましくは6～8に保ち、反応温度を15～45℃、望ましくは30～42℃に保つことで行うことができる。反応液中に生成した生産物は、反応液の上清を分離回収した後、生産物の特性に応じて沈殿形成やカラムクロマトグラフィーを用いて得ることができる。

【0014】

本発明のカルボン酸類またはアミド類の製造法の原料に用いられるニトリル類は、1分子中に少なくとも1個のニトリル基を有する脂肪族および芳香族の化合物である。オルソフタロニトリル、イソフタロニトリルおよびテレフタロニトリル等の芳香族ポリニトリル化合物が好ましく例示される。

【0015】

本発明のカルボン酸類の製造法の原料に用いられるアミド類は、アミド基を有

する脂肪族および芳香族の化合物である。オルソシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミド等のシアノ基を有する芳香族アミド化合物が好ましく例示される。

【0016】

【実施例】

以下実施例にて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0017】

実施例1；染色体DNAの調製

栄養（Lブロス）寒天平板培地で一昼夜培養した R. s p. ATCC39484 株一白金耳を基本培地（ KH_2PO_4 1.5 g/l、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g/l、 $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l、 $\text{CaSO}_4/2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l、 $\text{FeSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/l、酵母エキス 20 mg/l）にグルコース5 g/l、尿素2 g/lを加えた培地300 mlで30℃、1日間培養した。培養後の菌体を集菌し、5 mMのEDTA溶液100 mlで菌体を洗浄した。この菌体を30 mlの緩衝液（20 mMトリス・塩酸緩衝液（pH7.1））に懸濁し、60 mgのリゾチームを加え37℃で2時間インキュベートした。この懸濁液を遠心（5000 rpm, 7分間）して菌体を回収し、11.34 mlのTE Bufferに再懸濁し、10% SDS 0.6 mlを加え、さらに100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるようにプロテナーゼK（メルク社製）を加え、1時間、55℃でゆるやかに振盪した。この溶液をフェノール抽出、エタノール沈殿することによって染色体DNAを調製した。

【0018】

実施例2；染色体ライブラリーの作成

得られた染色体DNA 20 μg に対し制限酵素 S a u 3 A I を用いて部分消化を行った。即ち、染色体DNAを4 μg づつ5本のチューブにとり、100 μl の反応容器中で、制限酵素 S a u 3 A I（宝酒造社製、4～12 U/ μl ）を添加し37℃で反応させ、10秒毎にチューブの一本を取り、終濃度20 mMとなるようEDTAを加え反応を停止させた。このようにして調製した染色体DNAの

部分消化断片溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、5～10 kbのDNA断片を沈殿抽出およびエタノール沈殿にて回収し、30 μ lのTE溶液に溶解させた。この試料の9 μ lと1 μ gのBamHI消化後BAP処理したpUC18（宝酒造社製、pUC18/BamHI）とをT4DNAリガーゼ（宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2）を用いて20 μ lの計でライゲーションした後、大腸菌JM109株を形質転換した。このライブラリーの増幅ライブラリーを作製するために、大腸菌形質転換体をアンピシリン50 ppmを含むLBプロス（pH 7.0）に植菌し、一昼夜培養した菌体からアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出した。

【0019】

実施例3；ニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼの精製

アンカーPCRに必要な酵素配列に由来する一方のプライマーは、以下のようにして調製した酵素ペプチドのN末端配列から、適当なT_mを持つように配列を選択して作成した。

【0020】

ニトリルヒドラターゼ活性またはアミダーゼ活性は、それぞれベンゾニトリル10 mMまたはベンズアミド10 mM、リン酸カリウムバッファー（pH 7.0）30 mM、および所定量の菌体抽出液を含む反応混合液1 mlについて、25℃で30分間反応を行わせてから、生成したベンズアミドあるいは安息香酸をHPLCにより検出することにより定性的に行った（HPLC分離条件は後述の実施例8と同様。）。

【0021】

R. s.p. ATCC 39484株を実施例1の基本培地に誘導基質として1 g/lのベンゾニトリルを添加したニトリル分解酵素群誘導培地600 mlに植菌し、30℃で振とう培養した。

【0022】

一昼夜培養した培養液を遠心（8000 rpm、15分間）に供して菌体を回収し、得られた菌体湿質量3.2 gを100 mMリン酸カリウムバッファー（pH 7.0、1 mM EDTAおよび2 mM DDTを含む）50 mlで洗浄した後、

同バッファー200 mlに懸濁した。これを超音波破碎機に供して菌体を破碎した後、遠心(12,000 rpm、20分間)して上清(粗酵素抽出液)180 mlを得た。

【0023】

この無細胞抽出液に45%飽和濃度になるよう硫酸アンモニウムを添加し、4℃で1時間攪拌後、生成した沈殿を遠心分離によって除去した。分離した上清にさらに硫酸アンモニウムを60%飽和濃度になるよう添加し、4℃で1時間攪拌した後、遠心分離により沈殿を回収した。生成した沈殿にはニトリルヒドラーゼ活性およびアミダーゼ活性が確認できた。得られた沈殿を100 mMリン酸カリウムバッファー(pH 7.0、1 mM EDTAおよび2 mM DDTを含む)10 mlに溶解し、同バッファーに対して透析を行なった。

【0024】

100 mMリン酸カリウムバッファー(pH 7.0、1 mM EDTAおよび2 mM DDTを含む)で平衡化したDEAE-Sephacelカラム(2 cm×20 cm)に、透析した粗酵素溶液を供し、平衡化バッファーで溶出液のUV 280 nmが低下するまで洗浄した。続いて、0.1 M KClを添加した同バッファーで溶出液のUV 280 nmが低下するまで洗浄し、さらに0.2 MにKCl濃度を上げたバッファーで同様に溶出液のUV 280 nmが低下するまで洗浄した。その後、0.3 MにKCl濃度を上げた100 mMリン酸カリウムバッファー(pH 7.0、1 mM EDTAおよび2 mM DDTを含む。)でニトリルヒドラーゼとアミダーゼを溶出した。活性を示すフラクションを集め、限外濾過膜(分子量30,000 cut)を用いて酵素タンパク質を濃縮した。

【0025】

100 mMリン酸カリウムバッファー(pH 7.0、10%飽和濃度の硫酸アンモニウムを含む。)で平衡化したPhenyl-Sepharose CL4Bカラム(2 cm×40 cm)に、濃縮した活性画分に10%飽和濃度の硫酸アンモニウムを添加したものを供し、酵素を吸着させた。平衡化バッファーで溶出液のUV 280 nmが低下するまで洗浄した。その後、溶出バッファー(100 mMリン酸カリウムバッファー(pH 7.0))でニトリルヒドラーゼおよび

アミダーゼを溶出した。活性フラクションを集め、限外濾過膜（分子量30,000 cut）を用いて酵素タンパク質を濃縮した。

【0026】

この濃縮したニトリルヒドラターゼ活性画分を100mMリン酸カリウムバッファー（pH7.0、0.5M NaClを含む）で平衡化したSephacryl S-300 スーパーファインカラム（2cm×60cm）に供し、同バッファーを用いて分離を行い、溶出液を約0.5mlずつフラクションした。この段階で、ニトリルヒドラターゼとアミダーゼ活性が最も高いフラクションが分かれたため、それぞれ最も高い活性およびその前後のフラクションをそれぞれ回収した。それぞれ約1.5mlのフラクションを限外濾過膜（分子量30,000 cut）を用いて濃縮した。

【0027】

実施例4；ペプチド末端配列の決定

得られたニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼのN末端配列の決定を試みたが、いずれの酵素についてもエドマン分解におけるシグナル強度が低く、配列決定ができなかった。そこで酵素タンパク質を臭化シアン（BrCN）法により加水分解し、生成したペプチドを以下の液体クロマトグラフ条件で分離した。

【0028】

本体；LC 9A（島津製作所）

カラム；Asahipak ODP 50 6D（Shodex）

カラム温度；25℃

溶離液；アセトニトリル0～80%（直線濃度勾配、60分間）、

0.1%トリフルロ酢酸、

流速0.5ml/分

検出；SPD?6AV UV VIS Spectro

photometer（島津製作所）、

215nm

ニトリルヒドラターゼ活性画分から得られた複数のペプチドのうち、比較的分離の良いサンプルを選択し、再度エドマン分解によるN末端配列分析を行ったと

ころ、既存のニトリルヒドラターゼの配列と相同性の高い以下の配列が確認できた。

G l u (E) · T y r (Y) · A r g (R) · S e r (S) · A r g (R) · V a l (V) · V a l (V)

この配列と R h o d o c o c c u s 属細菌の C o d o n U s a g e を考慮して、ニトリルヒドラターゼ用プライマーを作成した。

5' - G A G T A C C G G T C C C G A - 3' (およびその相補鎖)

同様に、アミダーゼ活性画分から得られた複数のペプチドのうち、比較的分離の良いサンプルを選択し、エドマン分解によるN末端配列分析を行ったところ、既存のアミダーゼの配列と相同性の高い以下の配列が確認できた。

A l a (A) · V a l (V) · G l y (G) · G l y (G) · A s p (D) · G l n (Q) · G l y (G)

この配列と R h o d o c o c c u s 属細菌の C o d o n U s a g e を考慮して、アミダーゼ用プライマーを作成した。

5' - G C A G T C G G C G G C G A C - 3' (およびその相補鎖)

【0029】

実施例5；アンカーPCR

PCR法は以下の反応条件でおこなった。

【0030】

反応液組成：

R. s p. A T C C 3 9 4 8 4 染色体DNAライブラリー

1 μ g

ユニバーサルプライマー

100 p m o l

酵素ペプチド末端プライマー

100 p m o l

d N T P 溶液

各 1 m M

10 x 反応バッファー

10 μ l

E x T a q DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)

2. 5 U n i t

計 50 μ l

反応条件：

熱変性	94℃、45秒
アニーリング	37～60℃、60秒
伸張	72℃、60～90秒
サイクル数	24回

このようにして行った反応のうち、特異的に増幅される断片が見られた反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、断片を含む部分のゲルを切り出し、E S A Y T R A P ver. 2 (宝酒造社製)を用いて精製した。このDNA断片について、d i d e o x y法によりDNA配列を決定し、翻訳されたアミノ酸配列が既知のニトリルヒドラーゼまたはアミダーゼと相同性があることを確認した。その結果、得られた断片4、14中に、それぞれ既知のニトリルヒドラーゼ、アミダーゼと相同性の高い配列が含まれていることが分かった。断片4には約500bpのニトリルヒドラーゼ相同配列が、断片14には約900bpのアミダーゼ相同配列が含まれており、いずれも次のコロニーハイブリダイゼーションに用いるプローブとして十分な長さであった。

【0031】

実施例6；コロニーハイブリダイゼーション

実施例5で得られたニトリルヒドラーゼ遺伝子の一部、およびアミダーゼ遺伝子の一部を含むPCR断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法により全遺伝子のクローニングを行った。実施例2の方法に従ってS a u 3 A Iで分解した染色体DNAの部分消化断片溶液を1%のアガロースゲル電気泳動に供し、4～8kbのDNA断片を泳動抽出およびエタノール沈殿にて回収し、乾燥後30μlのTE溶液に溶解した。この試料溶液の9μlと、1μlのB a m H I消化後B A P処理したp U C 1 8 (宝酒造社製、100ng)とをT4 DNAリガーゼ (宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2)を用いてライゲーションした後、大腸菌J M 1 0 1株を形質転換し、イソプロピルーB-D-チオガラクトピラノシド (I P T G) 0.1mM、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルーβ-D-ガラクトピラノシド (X-g a l) 0.004%、アンピシリン50ppmを含むLブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に塗布して37℃で一昼夜培養した。

【0032】

生じた白色コロニーを、アンピシリン50ppmを含むLブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に釣菌し、37℃で一昼夜培養した。十分生育した後、寒天平板培地を約2時間4℃に置き冷却した。乾いたナイロンメンブレン（アマシャム ファルマシア バイオテク社製、Hybond-N⁺）に上下左右の印を鉛筆で付けた後冷却した平板培地の上に静かに置き、メンブレンが全体に濡れてくるのを待って静かにかつ一気にはがし、平板上のコロニーをメンブレンに移し取った。移し取った菌体が少ない時は、メンブレンをアンピシリン50ppmを含むLブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に置き、37℃で一昼夜培養した。

【0033】

菌体に移したメンブレンを3mlのアルカリ溶液（NaOH0.5M）上に浮かせ、菌体を溶解した。溶解した菌体の残査を、5×SSCで20分間×2回洗浄して落とした。このメンブレンに対し、Random prime DNA labelling and detection system（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション?検出の手順は、同キット添付のマニュアルに従って標準的な条件で行った。約8000コロニーに対して行ったハイブリダイゼーションの結果、各遺伝子について各1株のポジティブクローンが得られた。

【0034】

これらのポジティブクローンからアルカリーSDS法によりプラスミドを抽出し、プローブ用部分断片中にある制限酵素切断サイトの位置と、プラスミドの制限酵素分解パターンとを比較して、挿入断片中の遺伝子の位置と方向を推定した。その結果、ニトリルヒドラターゼのクローン株P11から調整したプラスミドpUNH11は全ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含んでいることが分かったが（図1）、アミダーゼのクローン株P12から調製したプラスミドpUAMD12は制限酵素処理パターンが複雑であり、遺伝子の位置方向を特定することができなかった。そこでpUAMD12に関してのみさらに制限酵素処理したフラグメントに対するサザンハイブリダイゼーションを行い、全構造遺伝子領域を含んで

いることを推定した(図1)。

【0035】

実施例7；欠損変異株の作成と塩基配列の決定

pUNH11およびpUAMD12はそれぞれ3kb?4kbの挿入断片を含むプラスミドであり、そのままでは塩基配列の決定が困難であった。そこでExonuclease IIIを用いて末端から挿入断片を欠損させた欠損変異体(deletion mutant)の作成を試みた。変異体の作成にはkilo?sequence用Deletion Kit(宝酒造社製)を用いた。すなわち、pUNH11またはpUAMD12溶液25マイクロリター(0.4mg/mlとして約16マイクログラム)をSse8387I、XbaIで完全分解(37℃、24時間)し、フェノール抽出で精製後、1/10容量の3M酢酸Naと2.5容量のエタノールを加えて沈殿させた。遠心して沈殿を回収し、70%冷エタノールで一回洗浄した後、真空乾燥沈殿を100マイクロリターのExo III bufferに溶解した。DNA溶液に1マイクロリターのExonuclease IIIを加え、ボルテックスで攪拌後、37℃でインキュベートし、10秒および30秒後に各50マイクロリターをサンプリングした(反応を停止するため、用意してあったMB nuclease buffer各50マイクロリターと混合。)

【0036】

この反応液にMB nuclease 2マイクロリターを添加し、37℃で20分間インキュベートした。反応終了後、フェノール抽出して精製し、1/10容量の3M酢酸Naと2.5容量のエタノールを加えて沈殿させた。遠心して回収し、70%冷エタノールで一回洗浄した後真空乾燥させた沈殿を50マイクロリターのklenow bufferに溶解し、klenow fragment 1マイクロリターを加え37℃で15分間インキュベートした。この反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、3つの鎖長域に分画した(ゲルよりそれぞれ切り出し、抽出回収。)

【0037】

切り出した断片の回収液10マイクロリターを100マイクロリターのlig

ation solution Aと混合し、ligation solution B 12マイクロリターを加え、ボルテックスで攪拌後16℃で24時間反応させ、セルフライゲーションさせた。このプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換した。

【0038】

この操作により、pUNH11については20種以上の欠損変異体が取得でき、この中から適当な長さの挿入断片を含む変異体7種を選択し、配列決定に用いることにした。しかし、pUAMD12に関してはもとのプラスミドより大きなプラスミドや用いたベクターより小さなプラスミドが生成するなど、適当な欠損体が取得できないことが判った。そこでpUAMD12に関しては逐次プライマーを合成しながら配列を決定するgene walking法による配列決定を行うことにした。

【0039】

塩基配列の決定はdideoxy法により、pUNH11は挿入断片の全域に相当する約2.8kbのDNA配列、pUAMD12は挿入断片の約2/3に相当する約2.8kbのDNA配列を決定した。プローブとして用いた部分断片配列と一致する部分を探索したところ、pUNH11、pUAMD12それぞれの挿入断片のEcoRIサイト側から約0.2kb、1.1kb下流から、ニトリルヒドラターゼ遺伝子はlacプロモーターに対して逆順に、アミダーゼ遺伝子は正の方向に存在していることが分かった。この方向と位置は、pUNH11に関しては制限酵素の切断断片生成パターンから推定した遺伝子の位置と方向に、pUAMD12に関しては制限酵素の切断パターンとサザンハイブリダイゼーションの結果から推定されたものと一致していた。これらの遺伝子配列から翻訳されたアミノ酸配列は、既知のいずれのニトリルヒドラターゼ、アミダーゼのアミノ酸配列とも異なる新規なものであった。

【0040】

実施例8；ニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼ活性の測定

ニトリルヒドラターゼ活性は20mMリン酸緩衝液(pH7.0)10mlにテレフタルニトリル(TPN)を基質として1~10質量%を懸濁した反応液に

、菌体（湿質量で1g前後）を加えて30℃で振とうしながら反応を行い、一定時間毎に反応液中に生成したパラシアノ安息香酸アミドをHPLCで定量することによって測定した。通常、反応液から固形物を遠心分離して除去した後、上清を溶離液で100倍希釈したものをHPLCサンプルとして用いた。アミダーゼ活性は基質としてパラシアノベンズアミドまたはベンズアミドを用い、同じ条件で反応させ、生成したパラシアノ安息香酸または安息香酸をHPLCで定量することによって測定した。

【0041】

各生成物の定量は、以下の装置・条件で行った。

装置：ポンプ；DS-2 (Shodex)

検出器；SPD-6AV UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu)

サンプル導入；Autosampler Model23 (SIC) with 20 ul sample tube

記録；Chromatocoder 12 (SIC)

カラム；ODSpak F-411 (Shodex), 4.6×150mm, 40℃

分離条件；AcCN/H₂O=50:50, 0.1%TFA, 1ml/min.

活性は乾燥質量1gの菌体が1時間に1lの反応液中に生成するパラシアノ安息香酸アミド、パラシアノ安息香酸または安息香酸のg質量（g/l/hr/g乾燥菌体）で表すことにした。

【0042】

実施例9；高発現株の作成

実施例6で得たポジティブクローンP11またはP12株をアンピシリン50ppmを含むLBプロスで培養すると、イソプロピルーB-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）の存在の如何に関わらず弱いニトリルヒドラターゼ活性が確認できた。しかしこの活性はドナーであるロドコッカス属細菌の数十分の一という低いものであった。他方のP12株にはアミダーゼ活性はまったく認められなかった。

【0043】

そこで酵素生産量を増やすため、それぞれの酵素構造遺伝子部分のみの断片をPCRで作成し、pUC18のlacプロモーター直後につないだプラスミドp

UNHE1 および pUAMDE1 を作成した。さらにこの両断片を同じプラスミド上に乗せたプラスミド pUNHAMDE1 を作成した。

【0044】

PCR断片作成に用いたプライマーおよび反応条件は以下の通り。

pUNHE1

(フォワード)

5'・acc atg gat ggt atc cac gac・3'

(βサブユニット開始コドン) (NcoIサイト)

(リバーズ)

5'・cc aag ctt tca tac gat cac ttc・3'

(αサブユニット終止コドン) (HindIIIサイト)

pUAMDE1

(フォワード)

5'・acc atg gct tcg ttg act cc・3'

(NcoIサイト、アミノ酸3番目Ser→Alaに変異)

(リバーズ)

5'・cc aag ctt tca gga cgg cac cga・3'

(HindIIIサイト)

反応液組成：

プラスミドDNA	0.8～1 μg
プライマー	各100 pmol
dNTP溶液	各1 mM
10×反応バッファー	10 μl
ExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製)	2.5 U
	計50 μl

反応条件：

熱変性	94℃、60秒
アニーリング	55℃、60秒
伸長	72℃、120秒

サイクル数

24回

ニトリルヒドラターゼ遺伝子、アミダーゼ遺伝子共に、生成した断片をアガロースゲル電気泳動し、抽出・回収した後、断片を制限酵素NcoIとHindIIIで切断し、EcoRI/NcoIリンカーとライゲーション後、EcoRI/HindIIIカットしたpUC18とライゲーションした(図2)。

【0045】

ニトリルヒドラターゼ遺伝子とアミダーゼ遺伝子を同じプラスミド上に乗せたプラスミドは、まずニトリルヒドラターゼ断片を制限酵素NcoIとHindIIIで切断し、EcoRI/NcoIリンカー、HindIII-NcoIリンカーの順でライゲーション後、NcoIとHindIIIで切断したアミダーゼ断片とライゲーションし、最後にEcoRI/HindIIIカットしたpUC18とこの断片をライゲーションした(図3)。

【0046】

これらのプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換し、得られた形質転換体をアンピシリン50ppmを含むLBプロスで一昼夜培養した後、イソプロピルーB-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を0.1mMになるよう培養液に加えてさらに2時間培養した。得られた形質転換体のニトリル変換活性を実施例8に示した方法により測定したところ、いずれのプラスミドで形質転換した形質転換体も、ドナーであるロドコッカス属細菌より高い活性が確認できた。両方の遺伝子を乗せたプラスミドで形質転換したもののみは、ドナーと同等の活性を示した。

【0047】

【表1】

株	非誘導時の活性	誘導時の活性
R. s p. ATCC 39484	-	0.17 ¹⁾
pUNH11形質転換体	0.009	0.007
pUAMD12形質転換体	nd	nd
pUNHE1形質転換体	0.35	0.41
pUAMDE1形質転換体	0.11	0.27
pUNHAMDE1形質転換体	0.11 ²⁾	0.13 ²⁾

【0048】

活性単位：g / l / h r / g 乾燥菌体

1) ドナーの活性はアミドの生成速度のみ（酸の生成速度はニトリラターゼの影響のため正確に測定不能）

2) p UNHAMDE 1 はニトリル→酸生成速度を測定

【 0 0 4 9 】

【発明の効果】

本発明は複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつロドコッカス属細菌のニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼ遺伝子を提供するものである。これらのDNA配列は、ニトリルヒドラターゼ、アミダーゼの遺伝子工学的手法を用いた効率的生産やタンパク質工学的手法を用いた酵素の改良などに不可欠なものであり、このようにして得た酵素は有用化合物の工業的生産への応用に期待できる。

【 0 0 5 0 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 クローン株から調製したプラスミドの構造。

【図 2】 発現用プラスミドの構築（1）。

【図 3】 発現用プラスミドの構築（2）。

【 0 0 5 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K.K.

<120> Rhodococcus sp. ATCC39484 genes for nitrile hydratase and amidase.

<130> 11H120068

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2822

<212> DNA

<213> Rhodococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1379)..(2068)

<223> nitrile hydratase beta subunit

<220>

<221> CDS

<222> (2082)..(2693)

<223> nitrile hydratase alfa subunit

<400> 1

ctagaggatc tcggtcatcg cgataccatc gttgcggacg atgatgtcca atacgtacca 60

ctggtccgcg gtcaacttct cttgatcgac cacgttatgg attctacgac tcagggaccg 120

gctcacggct tccagggcgc ctccgaccaa aggtgatcga acgacatttc cggattcagc 180

caccgcttc gactcgatca ttctgtccc tccccgtcca cgcgcagttg atcttacctc 240

ctcatcaaga ggatatccac tgaacgaatt atttcaagtg gaagtacttg gattcgatcc 300

tacacgtgag tggacgatgc ctgggcgcta gtcggatgtg caaccacccc accccctcct 360

cccgcctacg ccgaagaccg gaaccggcgt cgtccctgcc tgccgtctct ggcaactgtt 420

gtgaacgccc gagcggccct cacggctctt cagttggcgc ggatcgccat ggcggacgtc 480

gcccacggcg ggacctacgc atcttcggcc ggaaggcagc cgcggtcacg aacacctagc 540

ggcagtcgag cacctgagac gaaggccgcc ggcgtcctgt cccggaaatc cgcagcccag 600

ccgtgacagc caacagtcgt ggcggttccc tcccctccta gggtcittga ctcggcgcca 660

acgcctgcga gggcgctcgt cgcggaccac ttgtcgaggt cggtgccgca cgtcaccgag 720

cgcacccttc ttcgtgctct gcgcacggc ccggaccgag accgcggcaa cactacgagc 780

tctgacaatg ctgatcccct gccgccgccc ttggacgacc acagttgcta cgagcatgag 840

gagccaacca taggcatcat gcgatcgccg gagtcttcat cctattttgg gatgcgcagg 900

attaacacat ctacacattg acatccgttc cgatgtgaag taaaaattgt cacgtagggc 960

ggcaggcgaa gtctgcagct cgaacatcga aggggtgggag ccgagagatc ggagacgcag 1020

acacccggag ggaacttagc ctcccggacc gatgcgtgtc ctggcaacgc ctcaagattc 1080

agcgcaagcg attcaatctt gttacttcca gaaccgaatc acgtccccgt agtgtgcggg 1140

gagagcgccc gaacgcaggg atggtatcca tgcgccccct ctttttcga acgagaaccg 1200

gccggtacag tcaatccgga cacatttga cgcggttcaa cgattgttgt gctgtgaagg 1260

attcactcaa gccaaactgat atcgccattc cgttgccgga acatttgacg ctttctccct 1320

acgagtagaa gccagctgga ccctctttga gccagctcc gatgaaagga atgaggaa 1378

atg gat ggt atc cac gac aca ggc ggc atg acc gga tac gga ccg gtc 1426

Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val

1

5

10

15

ccc tat cag aag gac gag ccc ttc ttc cac tac gag tgg gag ggt cga 1474

Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg

20

25

30

acc ctg tcg att ctg acc tgg atg cat ctc aag ggc atg tcg tgg tgg 1522

Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Met Ser Trp Trp

35

40

45

gac aag tcg cgg ttc ttc cgg gag tcg atg ggg aac gaa aac tac gtc 1570

Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val

50

55

60

aac gag att cgc aac tcg tac tac acc cac tgg ctg agt gcg gcg gaa 1618

Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu

65

70

75

80

cgt atc ctc gtc gcc gac aag atc atc acc gaa gaa gag cga aag cac 1666

Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His

85

90

95

cgc gtg cag gag atc ctc gag ggt cgg tac acg gac agg aac ccg tcg 1714

Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Asn Pro Ser

100

105

110

cgg aag ttc gat ccg gcc gag atc gag aag gcg atc gag agg ctt cac 1762

Arg Lys Phe Asp Pro Ala Glu Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His

115

120

125

gag ccc cac tcc cta gtg ctt cca gga gcg gag ccg agt ttc tcc ctc 1810

Glu Pro His Ser Leu Val Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu

130

135

140

ggt gac aag gtc aaa gtg aag aac atg aac ccg ctg gga cac aca cgg 1858

Gly Asp Lys Val Lys Val Lys Asn Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg

145

150

155

160

tgc ccg aag tat gtg cgg aac aga atc ggg gaa atc gtc acc tcc cac 1906

Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Arg Ile Gly Glu Ile Val Thr Ser His

165

170

175

ggg tgc cag atc tat ccc gag agc agc tcc gcc ggc ctc ggc gac gat 1954

Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp

180

185

190

ccc cgc ccg ctc tac acg gtc gcg ttt tcc gcc cag gaa ctg tgg ggc 2002

Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly

195

200

205

gac gac gga aac ggg aaa gac gta gtg tgc gtc gat ctc tgg gaa ccg 2050

Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro

210

215

220

tac ctg atc tct gcg tga aaggaatagc ata gtg agc gag cac gtc aat 2099

Tyr Leu Ile Ser Ala

Val Ser Glu His Val Asn

225

230

5

aag tac acg gag tac gag gca cgt acc aag gca atc gaa acc ttg ctg 2147

Lys Tyr Thr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr Lys Ala Ile Glu Thr Leu Leu

10

15

20

tac gag cga ggg ctc atc acg ccc gcc gcg gtc gac cga gtc gtt tcg 2195

Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala Ala Val Asp Arg Val Val Ser

25

30

35

tac tac gag aac gag atc ggc ccg atg ggc ggt gcc aag gtc gtg gcc 2243

Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met Gly Gly Ala Lys Val Val Ala

40

45

50

aag tcc tgg gtg gac cct gag tac cgc aag tgg ctc gaa gaa gac gcg 2291

Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg Lys Trp Leu Glu Glu Asp Ala

55

60

65

70

acg gcc gcg atg gcg tca ttg ggc tat gcc ggc gag cag gca cac cag 2339

Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr Ala Gly Glu Gln Ala His Gln

75

80

85

atc tcg gcc gtc ttc aac gac tcc caa aca cat cac gta gtg gtg tgc 2387

Ile Ser Ala Val Phe Asn Asp Ser Gln Thr His His Val Val Val Cys

90

95

100

act ctg tgt tcg tgc tat ccg tgg ccg gtg ctt ggc ctc ccg ccc gcc 2435

Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala

105

110

115

tgg tac aag agc atg gag tac cgg tcc cga gtg gta gca gac cct cgt 2483

(Trp Tyr Lys Ser Met Glu Tyr Arg Ser Arg Val Val Ala Asp Pro Arg
120 125 130

gga gta ctc aag cgc gat ttc ggg ttc gac atc ccc gat gag gtg gag 2531
Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe Asp Ile Pro Asp Glu Val Glu
135 140 145 150

gtc agg gtt tgg gac agc agc tcc gaa atc cgc tac atc gtc atc ccg 2579
Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Ile Arg Tyr Ile Val Ile Pro
155 160 165

gaa cgg ccg gcc ggc acc gac ggt tgg tcc gag gac gag ctg gcg aag 2627
Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Asp Glu Leu Ala Lys
170 175 180

ctg gtg agt cgg gac tcg atg atc ggt gtc agt aat gcg ctc aca ccg 2675
Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly Val Ser Asn Ala Leu Thr Pro
185 190 195

cag gaa gtg atc gta tga gtgaagacac actcactgat cggctcccgg 2723
Gln Glu Val Ile Val
200

cgactgggac cgccgcaccg ccccgcgaca atggcgagct tgtattcacc gagccttggg 2783

aagcaacggc attcggggtc gccatcgcg tttcggatc 2822

<210> 2

<211> 229

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

<400> 2

Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val

1

5

10

15

Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg

20

25

30

Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Met Ser Trp Trp

35

40

45

Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val

50

55

60

Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu

65

70

75

80

Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His

85

90

95

Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Asn Pro Ser

100

105

110

Arg Lys Phe Asp Pro Ala Glu Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His

115

120

125

Glu Pro His Ser Leu Val Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu

130

135

140

Gly Asp Lys Val Lys Val Lys Asn Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg

145

150

155

160

Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Arg Ile Gly Glu Ile Val Thr Ser His

165

170

175

Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp

180

185

190

Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly

195

200

205

Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro

210

215

220

Tyr Leu Ile Ser Ala

225

<210> 3

<211> 203

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

{400} 3

Val Ser Glu His Val Asn Lys Tyr Thr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr

1

5

10

15

Lys Ala Ile Glu Thr Leu Leu Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala

20

25

30

Ala Val Asp Arg Val Val Ser Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met

35

40

45

Gly Gly Ala Lys Val Val Ala Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg

50

55

60

Lys Trp Leu Glu Glu Asp Ala Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr

65

70

75

Ala Gly Glu Gln Ala His Gln Ile Ser Ala Val Phe Asn Asp Ser Gln

80

85

90

95

Thr His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro

100

105

110

Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala Trp Tyr Lys Ser Met Glu Tyr Arg Ser

115

120

125

Arg Val Val Ala Asp Pro Arg Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe

130

135

140

Asp Ile Pro Asp Glu Val Glu Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu

145

150

155

Ile Arg Tyr Ile Val Ile Pro Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp
 60 165 170 175

Ser Glu Asp Glu Leu Ala Lys Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly
 180 185 190

Val Ser Asn Ala Leu Thr Pro Gln Glu Val Ile Val
 195 200

<210> 4

<211> 2822

<212> DNA

<213> Rhodococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1094)..(2491)

<223> amidase

<400> 4

tgattacgaa ttcgagctcg gtacccgggg atcacttcgg ccagagggtg acggcgaaat 60

cgggcctcga tctccgcgtc cacggcgttg atacgtgtgt cgaggtcgat caccgcctgc 120

gccaatcgg cgaccagttc ggcagcgaca tcttcccccg gcaaccgcac ggtctgcgcc 180

ttcgcggcgg tgactgcggc ccgggcgatc gattcggcgt ggcgcacccc ggccccggtg 240
agcattgcgg ccagtcgggc cgccccgacg cggcggatcg ctttcggtcg ctggtagcgg 300
gccagcagca ccaccagcc ccggtccgag gagatctgcg cgacgcgttc gagtccgggg 360
cagatcgca cgagtigctg acgcagccgg ttgatggtcc gggtacggtc ggcgaccaga 420
tcggtgcggt ggccggtgag catctgcagc tcacgatca actcgtcgtc gggacgcaga 480
acgggcaggt ccgaccgat ccgggactga tcggcgatca cccgggcgtc gcgggcgtcg 540
gtcttggtt cgccgncgcg gtagaccgac gatgcctgcc acaccgaacg tncggacagg 600
tagcgaccg gtttcccggc gtcggccagc acagtcagca acaaggtagc gtaggcggtg 660
gtcagatcca ccgtccagca caccgtctcg gtgagtgcgt cgatctcggt gatcaccgca 720
cggatcgttg cttcgtcgtt gtcacatgc cgcgacagca ccaccgtccc ggaggtgtcg 780
agtacgcata tccagtgggtg ttctttgccg acgtcgactc ctgcccacag ttgcgaaccg 840
gtcatcggtt ttctcgttt tcgcttgtgt tccggcctgg ccccgatgga cgcctncgcc 900
ggcatttcct taaacaagcg atcatgcga gatctcaatc agcgggtccag aggtgtccag 960
acaggtcggg tggccagtcc tttaagccc cactcgagag tgggcaaacc ttatgcagcc 1020

tcgccggcct gcccggtta cagctcaacg taactctcac gaagtaactg cacctacgaa 1080

cttaaggaac ctc atg tct tcg ttg act ccc ccc aat tcc aac caa atg 1129

Met Ser Ser Leu Thr Pro Pro Asn Ser Asn Gln Met

1

5

10

tcg gcc ctg aac aac cac ttc cga ttc gga ctg acg acg ccg gaa ctc 1177

Ser Ala Leu Asn Asn His Phe Arg Phe Gly Leu Thr Thr Pro Glu Leu

15

20

25

gaa gag ttc gca ccg gcc ctc gaa gcg acg ctc gcg tcc tcc gaa acc 1225

Glu Glu Phe Ala Pro Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr

30

35

40

gtc gaa cgc ctc tac gag cgc acc gcg ccc gag ccg cct cag cgg tca 1273

Val Glu Arg Leu Tyr Glu Arg Thr Ala Pro Glu Pro Pro Gln Arg Ser

45

50

55

60

tgg acc tca ccc acg gcg gac gag aac ccg ctg agc gcc tgg tac gtc 1321

Trp Thr Ser Pro Thr Ala Asp Glu Asn Pro Leu Ser Ala Trp Tyr Val

65

70

75

acc acc tcg atc agc gaa acc gac gaa ggc ccc ctc gcc ggg cga acg 1369

Thr Thr Ser Ile Ser Glu Thr Asp Glu Gly Pro Leu Ala Gly Arg Thr

80

85

90

gtc gcc gtg aaa gac aac gtc gca gtc gcc ggc gtg ccg atg atg aac 1417

Val Ala Val Lys Asp Asn Val Ala Val Ala Gly Val Pro Met Met Asn

95

100

105

ggc tcc cga acc gtc gag ggc ttc acc ccc cgc tac gac gcc acc gtc 1465

Gly Ser Arg Thr Val Glu Gly Phe Thr Pro Arg Tyr Asp Ala Thr Val

110

115

120

gta cgc cga ctg ctc gac gcc ggc gca acc atc acc ggc aaa gcg gtg 1513

Val Arg Arg Leu Leu Asp Ala Gly Ala Thr Ile Thr Gly Lys Ala Val

125

130

135

140

tgc gaa gat ctc tgc ttc tcc ggc gcc agc ttc act tcc cac ccc cag 1561

Cys Glu Asp Leu Cys Phe Ser Gly Ala Ser Phe Thr Ser His Pro Gln

145

150

155

ccg gtc cgc aac ccc tgg gac gaa agc cgc atc acc ggc ggc tcg tcc 1609

Pro Val Arg Asn Pro Trp Asp Glu Ser Arg Ile Thr Gly Gly Ser Ser

160

165

170

agc ggc agc ggc gcc ctg gtc gcc agc ggc cag gtg gat atg gca gtc 1657

Ser Gly Ser Gly Ala Leu Val Ala Ser Gly Gln Val Asp Met Ala Val

175

180

185

ggc ggc gac cag ggc ggt tcg atc cgc atc ccc gcc gcg ttc tgc ggc 1705

Gly Gly Asp Gln Gly Gly Ser Ile Arg Ile Pro Ala Ala Phe Cys Gly

190

195

200

atc gtc gga cac aaa ccc acc cac gga ctg gtc ccc tat acg gga gca 1753

Ile Val Gly His Lys Pro Thr His Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Ala

205

210

215

220

ttt ccc atc gaa cga acc atc gac cac ctc ggt ccg atg acg cgc acg 1801

Phe Pro Ile Glu Arg Thr Ile Asp His Leu Gly Pro Met Thr Arg Thr

225

230

235

gtc agc gac gcc gcc gca atg ctc acc gtc ctc gcc ggc acc gac ggc 1849

Val Ser Asp Ala Ala Ala Met Leu Thr Val Leu Ala Gly Thr Asp Gly

240

245

250

ctc gat ccc cga cag acc cac cgg atc gaa ccg gtg gac tac ctc gcg 1897

Leu Asp Pro Arg Gln Thr His Arg Ile Glu Pro Val Asp Tyr Leu Ala

255

260

265

gcg ctg gcc gaa ccc gca tcg ggt ctg cgc gtg ggt gtg gtc acc gaa 1945

Ala Leu Ala Glu Pro Ala Ser Gly Leu Arg Val Gly Val Val Thr Glu

270

275

280

ggc ttc gac acc cct gtc tcc gac gct gcc gtc gac aat gcc gtg cgc 1993

Gly Phe Asp Thr Pro Val Ser Asp Ala Ala Val Asp Asn Ala Val Arg

285

290

295

300

acc gcc atc ggc gta ctg cgc tcg gcc gga ctt acc gtc gaa gag gtc 2041

Thr Ala Ile Gly Val Leu Arg Ser Ala Gly Leu Thr Val Glu Glu Val

305

310

315

tcg atc ccc tgg cac ctc gat gcg atg gcc gtc tgg aac gtg atc gac 2089

Ser Ile Pro Trp His Leu Asp Ala Met Ala Val Trp Asn Val Ile Asp

320

325

330

cgg gcc gac gac gaa ttc gaa gcc ttc ctg ctg cag gtg ctc gac gag 2137

Arg Ala Asp Asp Glu Phe Glu Ala Phe Leu Leu Gln Val Leu Asp Glu
335 340 345

aac gcc gtc acc atc ccc gaa ctc gga cag gtg cgg gcg cag acg ccg 2185
Asn Ala Val Thr Ile Pro Glu Leu Gly Gln Val Arg Ala Gln Thr Pro
350 355 360

cgc tcg tgg tgc tca cct cga acc gca ccc gcg agg tgc acg acg ccc 2233
Arg Ser Trp Cys Ser Pro Arg Thr Ala Pro Ala Arg Cys Thr Thr Pro
365 370 375 380

tca aac gcc gct gcc tgt acc act ggc tcg aac acc ccg acc tcg cgc 2281
Ser Asn Ala Ala Ala Cys Thr Thr Gly Ser Asn Thr Pro Thr Ser Arg
385 390 395

ggg aag tgg aga tcc tgc gcc gcc gca tcc cgg gca tcg acg aac acc 2329
Gly Lys Trp Arg Ser Cys Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Thr Asn Thr
400 405 410

tcg cgg cgc agg tcg ccc acg ccg tgc agg cca tgc gcg gga tgg acc 2377
Ser Arg Arg Arg Ser Pro Thr Pro Cys Arg Pro Cys Ala Gly Trp Thr
415 420 425

tgc tca aac cac ccg ggg tcg cgg agt cgc tgg act ggg cac gag cgc 2425
Cys Ser Asn His Pro Gly Ser Arg Ser Arg Trp Thr Gly His Glu Arg
430 435 440

tgc ggg aac tcg acc gcg acg tgc tcg acg cga cga ccg cgg ccg cga 2473
Cys Gly Asn Ser Thr Ala Thr Cys Ser Thr Arg Arg Pro Arg Pro Arg

445

450

455

460

ccc tcg gtg ccg tcc tga agtaccggga ggacctcgac cgagtgggcc 2521

Pro Ser Val Pro Ser

465

gcaccgggct cgaccggctc ctgacggggt gacagcggcg atgacgacga ccaccgacgc 2581

cgggggttcc ctgctcgac tcaccggctt caccgcgcc ctgccgcgg ccggcctgtc 2641

cgctgcctcg gacgccaccg tggcctacct gcgcgccctg cgcgagatcg acctcggcga 2701

ccgccgtcag gtgtactggg ccgggcgcgc caccctgtgc cagacccccg acgacatccc 2761

ccgctacgac ctgcgttcg agagctggtt cggcggaacg gcacccgacg tgacgtcgcc 2821

g

2822

<210> 5

<211> 465

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

<400> 5

Met Ser Ser Leu Thr Pro Pro Asn Ser Asn Gln Met Ser Ala Leu Asn

1

5

10

15

Asn His Phe Arg Phe Gly Leu Thr Thr Pro Glu Leu Glu Glu Phe Ala

20

25

30

Pro Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Val Glu Arg Leu

35

40

45

Tyr Glu Arg Thr Ala Pro Glu Pro Pro Gln Arg Ser Trp Thr Ser Pro

50

55

60

Thr Ala Asp Glu Asn Pro Leu Ser Ala Trp Tyr Val Thr Thr Ser Ile

65

70

75

80

Ser Glu Thr Asp Glu Gly Pro Leu Ala Gly Arg Thr Val Ala Val Lys

85

90

95

Asp Asn Val Ala Val Ala Gly Val Pro Met Met Asn Gly Ser Arg Thr

100

105

110

Val Glu Gly Phe Thr Pro Arg Tyr Asp Ala Thr Val Val Arg Arg Leu

115

120

125

Leu Asp Ala Gly Ala Thr Ile Thr Gly Lys Ala Val Cys Glu Asp Leu

130

135

140

Cys Phe Ser Gly Ala Ser Phe Thr Ser His Pro Gln Pro Val Arg Asn

145

150

155

160

Pro Trp Asp Glu Ser Arg Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ser Gly Ser Gly

165

170

175

Ala Leu Val Ala Ser Gly Gln Val Asp Met Ala Val Gly Gly Asp Gln

180

185

190

Gly Gly Ser Ile Arg Ile Pro Ala Ala Phe Cys Gly Ile Val Gly His

195

200

205

Lys Pro Thr His Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Ala Phe Pro Ile Glu

210

215

220

Arg Thr Ile Asp His Leu Gly Pro Met Thr Arg Thr Val Ser Asp Ala

225

230

235

240

Ala Ala Met Leu Thr Val Leu Ala Gly Thr Asp Gly Leu Asp Pro Arg

245

250

255

Gln Thr His Arg Ile Glu Pro Val Asp Tyr Leu Ala Ala Leu Ala Glu

260

265

270

Pro Ala Ser Gly Leu Arg Val Gly Val Val Thr Glu Gly Phe Asp Thr

275

280

285

Pro Val Ser Asp Ala Ala Val Asp Asn Ala Val Arg Thr Ala Ile Gly

290

295

300

Val Leu Arg Ser Ala Gly Leu Thr Val Glu Glu Val Ser Ile Pro Trp

305

310

315

320

His Leu Asp Ala Met Ala Val Trp Asn Val Ile Asp Arg Ala Asp Asp

325

330

335

Glu Phe Glu Ala Phe Leu Leu Gln Val Leu Asp Glu Asn Ala Val Thr

340

345

350

Ile Pro Glu Leu Gly Gln Val Arg Ala Gln Thr Pro Arg Ser Trp Cys

355

360

365

Ser Pro Arg Thr Ala Pro Ala Arg Cys Thr Thr Pro Ser Asn Ala Ala

370

375

380

Ala Cys Thr Thr Gly Ser Asn Thr Pro Thr Ser Arg Gly Lys Trp Arg

385

390

395

400

Ser Cys Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Thr Asn Thr Ser Arg Arg Arg

405

410

415

Ser Pro Thr Pro Cys Arg Pro Cys Ala Gly Trp Thr Cys Ser Asn His

420

425

430

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Trp Thr Gly His Glu Arg Cys Gly Asn Ser

435

440

445

Thr Ala Thr Cys Ser Thr Arg Arg Pro Arg Pro Arg Pro Ser Val Pro

450

455

460

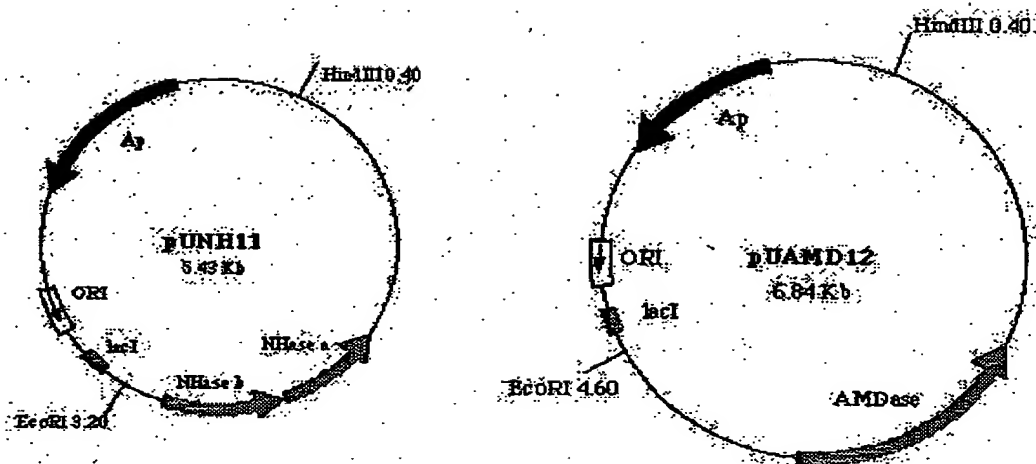
Ser

465

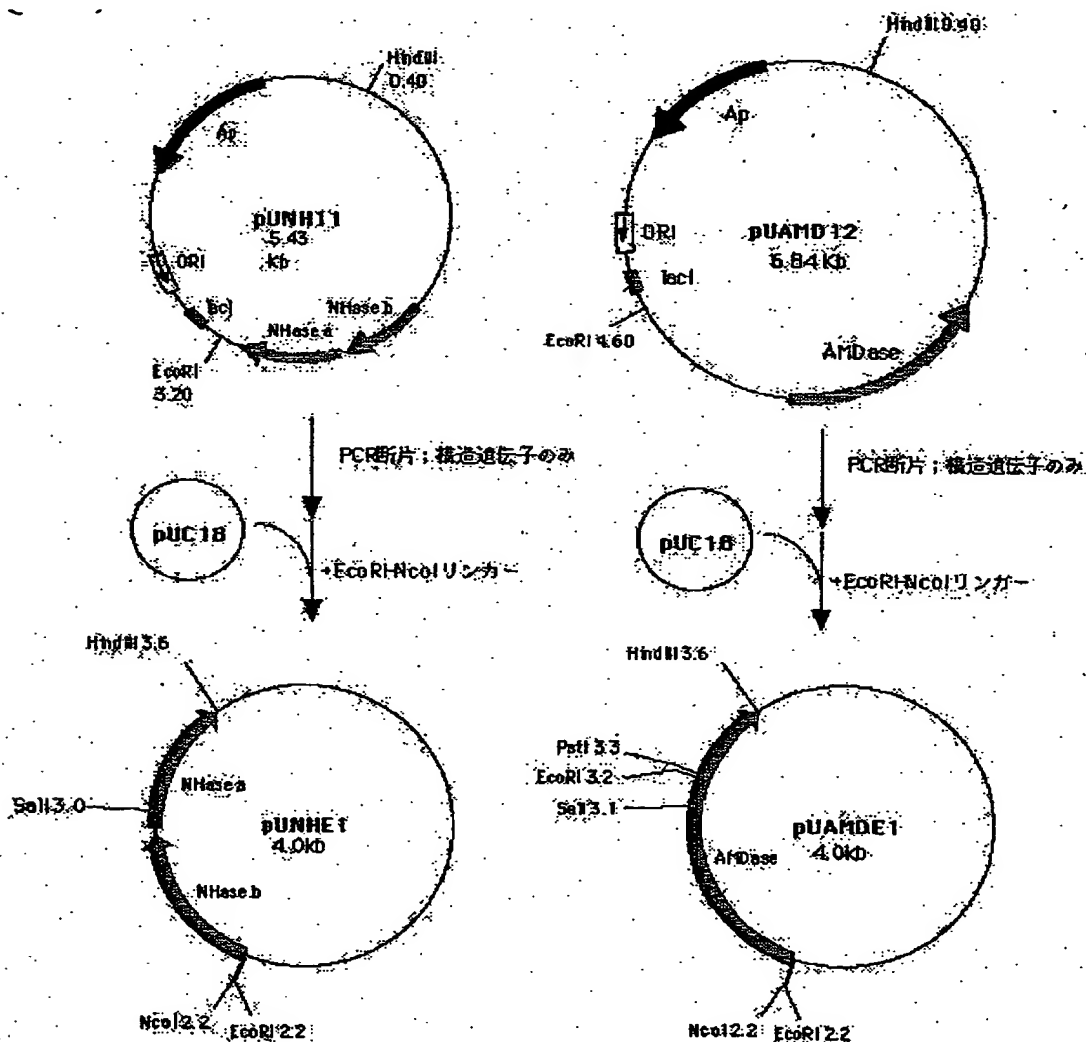
特2000-107855

【書類名】 図面

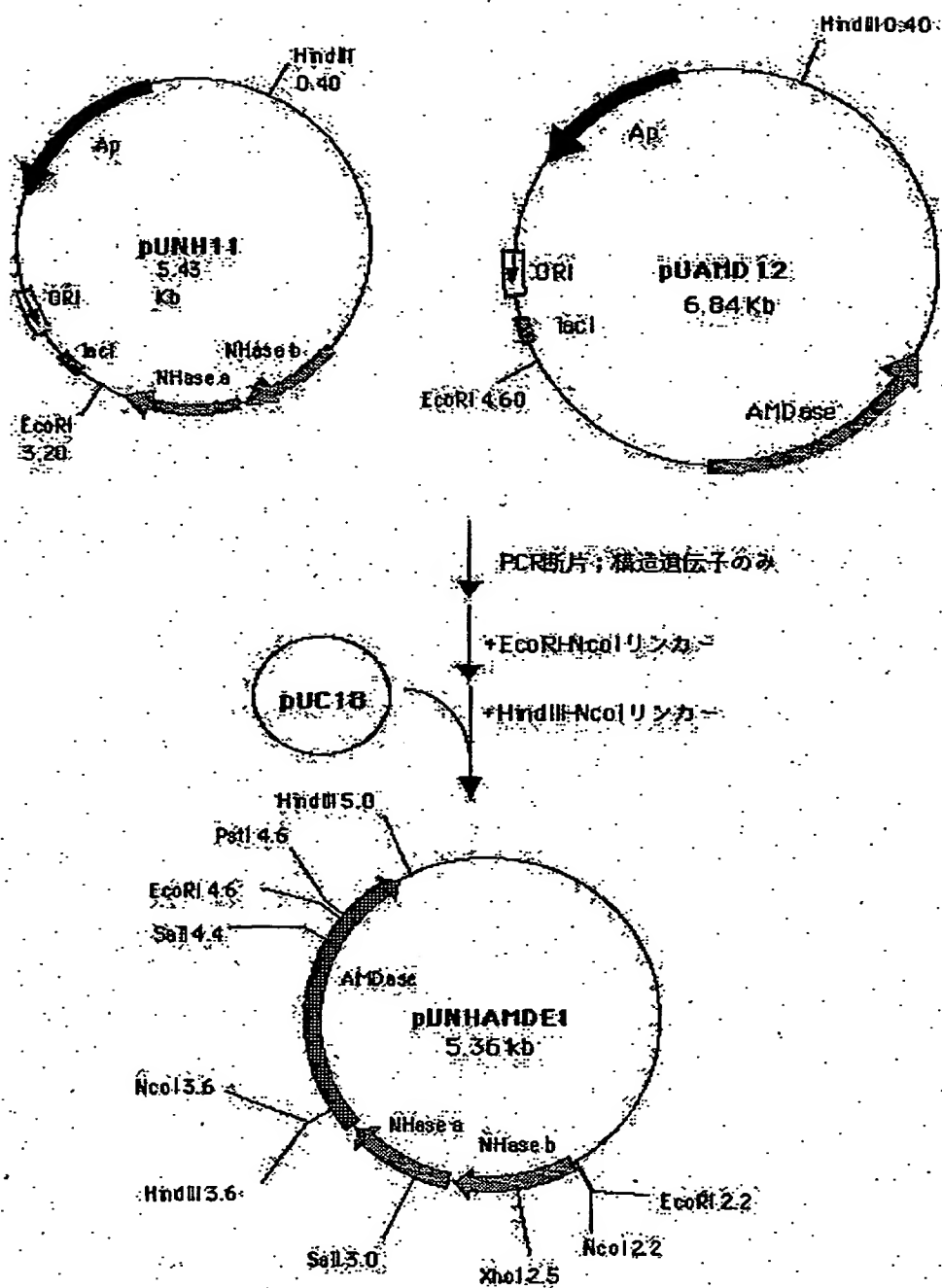
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼを、遺伝子工学的手法を用いて効率良く生産したり、タンパク質工学的手法を用いて改良するために必要なロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子、アミダーゼ遺伝子のDNA配列、該遺伝子を含む形質転換体を用いた酵素の製造法、および該形質転換体あるいはそれらによって製造された酵素を用いたアミド類またはカルボン酸類の製造法を提供することにある。

【解決手段】 配列表の配列番号2または3で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子および配列表の配列番号5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるアミダーゼ遺伝子を提供する。該ニトリルヒドラターゼおよび／またはアミダーゼ遺伝子DNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体を用いてニトリル類のニトリル基をアミド基、さらにカルボキシル基に変換することを特徴とするアミド類またはカルボン酸類の製造法を提供する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号

特願2000-107855

受付番号

50000449498

書類名

特許願

担当官

第三担当上席

0092

作成日

平成12年 4月11日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成12年 4月10日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002004]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区芝大門1丁目13番9号

氏 名 昭和電工株式会社